

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- BLURRY OR ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLATED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY DARK BLACK AND WHITE PHOTOS
- UNDECIPHERABLE GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

51

Int. Cl.:

C 07 d, 51/54

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



52

Deutsche Kl.:

12 p, 7/10

10

11

21

22

43

Offenlegungsschrift 2 405 895

Aktenzeichen: P 24 05 895.5

Anmeldetag: 7. Februar 1974

Offenlegungstag: 29. August 1974

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum:

7. Februar 1973

33

Land:

V. St. v. Amerika

31

Aktenzeichen:

330306

54

Bezeichnung:

In der 2-Stellung substituierte Derivate von cyclischem Adenosinmonophosphat und deren Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneipräparate

61

Zusatz zu:

—

62

Ausscheidung aus:

—

71

Anmelder:

ICN Pharmaceuticals, Inc., Irvine, Calif. (V.St.A.)

Vertreter gem. § 16 PatG:

Vossius, V, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

72

Als Erfinder benannt:

Meyer, Rich Bakke, Laguna Beach, Calif. (V.St.A.);
Shuman, Dennis Alan, Jalisco (Mexico)

DT 2405 895

2405895

u.Z.: K 653 (Vo/Mü/kä)

Case M-330 306-ICN

ICN-PHARMACEUTICALS, INC.

Irvine, Kalifornien, V.St.A.

" In der 2-Stellung substituierte Derivate von cyclischem Adenosinmonophosphat und deren Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneipräparate "

Priorität: 7. Februar 1973, V.St.A., Nr. 330 306

Die Erfindung betrifft in der 2-Stellung substituierte Derivate von cyclischem Adenosinmonophosphat und deren Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneipräparate.

Cyclisches Adenosinmonophosphat (c-AMP) ist ein intrazellulärer sekundärer Bote (second messenger), der die Wirkung einer Reihe von verschiedenen Hormonen beeinflusst; vgl. Sutherland, "Cyclic AMP", Am. Rev. Biochem., Bd. 37 (1968), S. 149. Nach der Theorie von Sutherland beeinflussen Hormone mit Primärwirkung (first messenger), wie Epinephrin und Norepinephrin, die an den Zellwänden oder innerhalb der Zellwände lokalisierte Adenylcyclase, wobei nach Empfangen eines extrazellulären Hormonsignals aus Adenosintriphosphat intrazellulär cyclisches AMP gebildet wird. Das gebildete cyclische AMP wirkt wiederum als sekundärer Bote

409835/1030

und stimuliert intrazelluläre Funktionen, die den "Zielzellen" des Hormons eigen sind. So wurde festgestellt, daß cyclisches AMP Proteinkinasen aktiviert, die wiederum physiologische Wirkungen hervorrufen, beispielsweise Muskelkontraktion, Glycogenolyse, Steroidsynthese und Lipolyse. Ein spezielles Beispiel für die Vermittlerrolle von c-AMP bei der Steroidsynthese ist die zelluläre Biosynthese und Absonderung von Corticosteroiden, die durch c-AMP hervorgerufen wird, das nach Empfang eines extrazellulären, durch das Peptidhormon ACTH bewirkten Signals durch Adenylcyclase innerhalb der Zellwände der Nebennierenrinde gebildet wird.

Um die vielseitige Rolle von c-AMP bei biologischen Vorgängen noch weiter zu erläutern, werden im folgenden verschiedene Stoffwechselreaktionen bzw. Wirkstoffe aufgezählt, bei denen c-AMP beteiligt ist oder eine Mittlerrolle spielt: Glucagon, Vasopressin, luteinisierendes Hormon, thyreotropes Hormon, Insulin, UDPG- α -Transglucosylase, Phosphofructokinase, Tryptophanpyrrolase, Ketogenese, Aminosäureeinbau in Leberproteine, Einbau von Acetat in Fettsäuren und Cholesterin in der Leber, Umwandlung von Lactat in Glucose (Gluconeogenese), Freisetzung von Amylase und Wasser, Ionenpermeabilität, Zuckertransport, Säuresekretion in der Magenschleimhaut, Hemmung der Aggregation von ^{Thrombocyten} Blutkörperchen, Repression von Kataboliten, Verstärkung der antiviralen Aktivität von Interferon, Hemmung von HeLa- und Stamm L-Zellen in Kulturen und Stimulierung der Antikörperbildung (immunologische Mechanismen).

Die sogenannten adrenergischen Wirkungen von vielen Hormonen und Arzneistoffen sind ebenfalls auf intrazelluläre Wirkungen von cyclischem AMP zurückzuführen, dessen Konzentration durch die Adenylcyclase und Cyclonucleotid -Phosphodiesterase kontrolliert wird. Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß die physiologische Wirkung von cyclischem AMP zumindest teilweise auf die Aktivierung von spezifischen Proteinkinasen durch das cyclische AMP zurückzuführen ist, beispielsweise in aus dem Zentralnervensystem isolierten Neurotubuli.

Nachdem die wichtige Rolle des cyclischen AMP immer mehr erkannt wurde, wurde vorgeschlagen, es bei Störungen von zellulären Vorgängen zu verabfolgen. Beispielsweise wird angenommen, daß Asthma durch einen genetisch bedingten Mangel an Adenylcyclase verursacht werden kann. Als Folgeerscheinung dieses Mangels ergibt sich eine verminderte Fähigkeit, intrazellulär ATP zu cyclischem Adenosinmonophosphat zu verarbeiten.

Cyclisches AMP wird jedoch in vivo durch Phosphodiesterase-Enzyme abgebaut, die die Hydrolyse des cyclischen Purinnucleotids zu 5'-Adenosinmonophosphat katalysieren, was mit einem Funktionsverlust verbunden ist. Dementsprechend wurde vorgeschlagen, substituierte cyclische AMP-Analoga, die gegen den Abbau durch Phosphodiesterasen widerstandsfähiger als natürlich vorkommende cyclische Nucleotide sind, aber trotzdem die biologische Aktivität der natürlichen Nucleotide aufweisen, zur Behandlung von Störungen von zellulären Prozessen zu verabfolgen. Durch solche c-AMP-Analoga sollten beispielsweise die gewünschten Konzentrationen von cyclischem Nucleotidmonophosphat mit

2405895

niedrigeren Dosen, als sie beim C-AMP selbst nötig sind, aufrechterhalten werden können. Außerdem sollte die unterschiedliche Spezifität der Phosphodiesterase gegen cyclische Nucleotide von stark unterschiedlicher Struktur die Verwertbarkeit dieser Verbindungen vergrößern, die von Diesterasen mit stark unterschiedlicher Spezifität verschieden stark angegriffen werden.

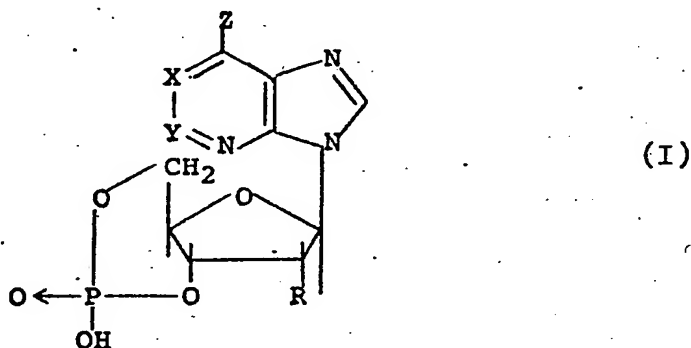
Nach Sutherland et al., Circulation, Bd. 37 (1963), S. 279, ist die pharmakologische Wirkung von Theophyllin auf die Fähigkeit dieser Verbindung, die Wirkung von Phosphodiesterasen zu hemmen, zurückzuführen. Theophyllin wurde deshalb anstelle von die Adenylcyclase stimulierenden Hormonen, wie Epinephrin und Norepinephrin, als herzstimulierendes Mittel nach Herzstillstand und als Bronchiendilatator bei hartnäckigen Bronchitisfällen verwendet. Theophyllin hemmt jedoch die Phosphodiesterase nicht selektiv, sondern bewirkt eher eine allgemeine Stimulierung des Zentralnervensystems. Deshalb kann die Verwendung von Theophyllin nervöse Störungen und Reizzustände sowie kardiovaskuläre Wirkungen, wie raschen Herzschlag, hervorrufen. Außerdem zeigt die Hemmwirkung von Theophyllin auf die Phosphodiesterase nicht die gewünschte Stärke. Infolgedessen muß es in größeren Mengen verwendet werden, die natürlich die vorgenannten unerwünschten Wirkungen verstärken.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Derivate von cyclischem AMP zur Verfügung zu stellen, die durch Phosphodiesterasen nicht abgebaut werden und diese Enzyme hemmen und zwar vorzugsweise selektiv. Außerdem sollen diese Verbindungen die Steroidsynthese

409835/1030

in der Nebenniere und die Proteinkinasen aktivieren.

Gegenstand der Erfindung sind in der 2-Stellung substituierte Derivate von cyclischem Adenosinmonophosphat der allgemeinen Formel I



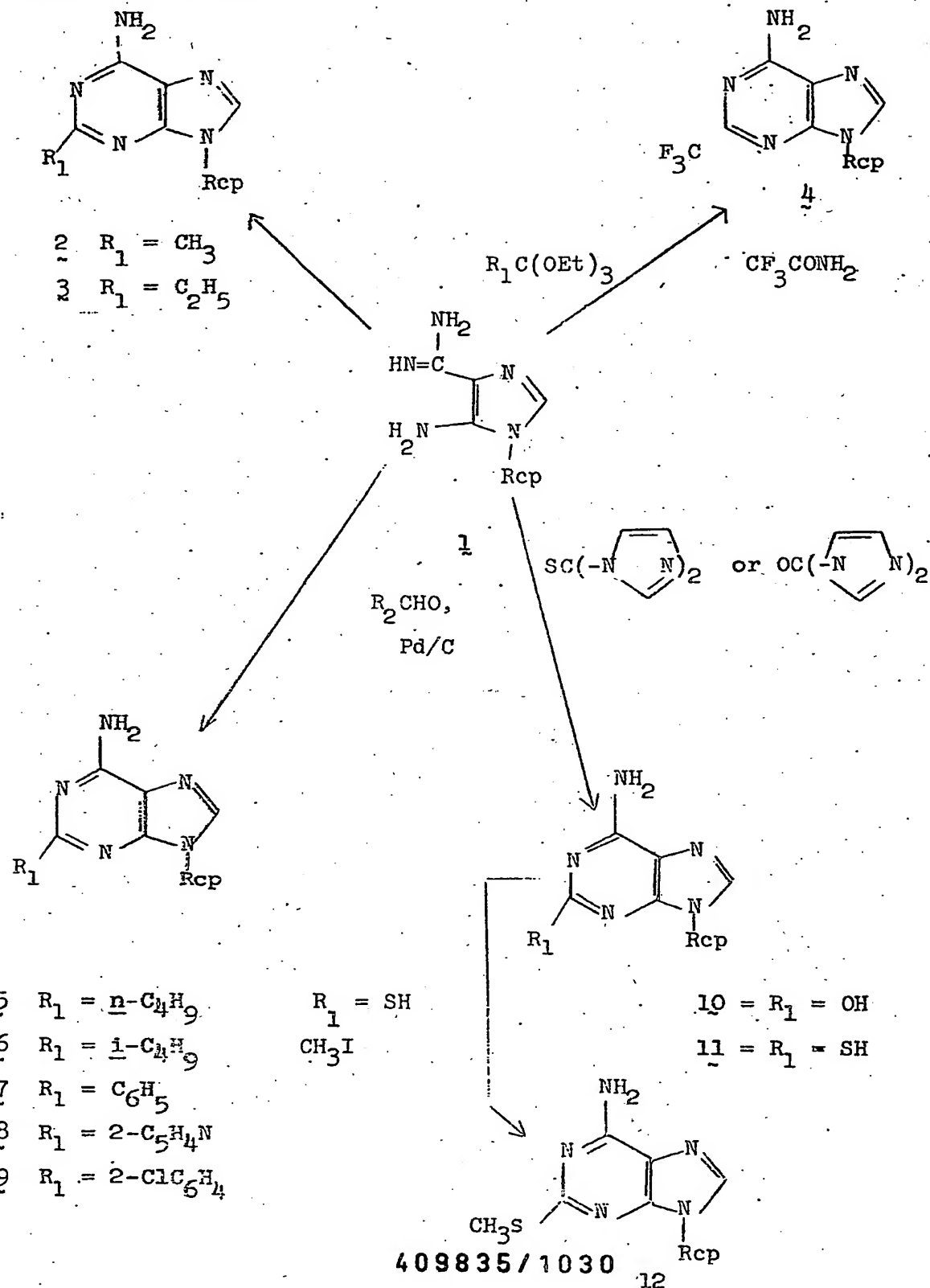
in der X ein Stickstoffatom oder ein N-Oxid bedeutet, Y ein Stickstoffatom oder einen CR_1 -Rest bedeutet, wobei R_1 einen Alkyl-, Phenyl-, 2- $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ -Rest, Trihalogenmethyl/ HO- , HS- oder $\text{R}_2\text{S-}$ Gruppe ist und R_2 einen Alkyl- oder Aralkylrest darstellt, Z die $\text{H}_2\text{N-}$ oder HO- Gruppe und R ein Wasserstoffatom, die HO- oder R'O- Gruppe bedeutet, wobei R' einen C_{1-18} -Acylrest darstellt, mit der Maßgabe, daß Z nur dann die HO- Gruppe bedeutet, wenn X und Y jeweils ein Stickstoffatom darstellen, und daß X nur dann ein N-Oxid bedeutet, wenn Y ein Stickstoffatom und Z die $\text{H}_2\text{N-}$ Gruppe darstellt, sowie die Salze dieser Verbindungen.

Beispiele für Salze sind Ammonium-, Alkalimetall- oder Alkylaminsalze. Die Alkylreste weisen im allgemeinen 1 bis 8 und vorzugsweise 1 bis 6 Kohlenstoffatome auf.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, daß in der 4-Stellung substituierte 5-Aminoimidazol-nucleotide einem Ringschluß unterzogen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I wird durch die folgenden beiden Reaktionsschemata erläutert, in denen "Rcp" 1- β -D-Ribofuransyl-3,5-cyclophosphat bedeutet. Die Symbole X, Y und Z haben die vorstehende Bedeutung. Im Reaktionsschema A bedeuten X ein Stickstoffatom, Y den $>CR_1$ -Rest und Z die H_2N -Gruppe. Et bedeutet die Äthylgruppe.

Reaktionsschema A



Als Ausgangsverbindung wird gemäß vorstehendem Reaktionsschema 5-Amino-1- β -D-Ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 1) verwendet. Diese Verbindung kann durch katalytische Hydrierung von N-Alkoxy-5-amino-1- β -D-ribofuransylimidazol-4-carboxamidin-3',5'-cyclophosphat hergestellt werden.

Die Verbindung 1 kann durch Behandlung mit einer Carbonsäure oder einem Aldehyd einem Ringschluß unterzogen werden. Beispielsweise führt eine Behandlung mit niederen Alkylorthoestern von niederen Alkylcarbonsäuren bei hohen Temperaturen, (oberhalb

100°C bis zum Siedepunkt der Orthoester, vorzugsweise etwa 130 bis 150°C) unter Ausschluß von Wasser und unter Verwendung eines Lösungsmittels, wie Dimethylsulfoxid, zu Derivaten von cyclischem AMP mit niederen Alkylsubstituenten in der 2-Stellung. Durch Umsetzung von Triäthylorthoacetat mit der Verbindung 1 erhält man 2-Methyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 2) in einer Ausbeute von 75 % d. Th.. Bei der Umsetzung von Triäthylorthopropionat mit Verbindung 1 erhält man 2-Äthyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 3) in einer Ausbeute von 66 % d. Th..

Durch Behandlung der Verbindung 1 mit Carbonsäureamiden mit stark elektronenziehenden Substituenten am α -Kohlenstoffatom, wie Trifluoracetamid, bei hohen Temperaturen (etwa oberhalb von 100°C bis zum Siedepunkt des Amids) in einem Lösungsmittel, wie Tetramethylharnstoff, erhält man in guten Ausbeuten 2-Trifluormethyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 4).

Durch Umsetzung anderer halogenierter Acetamide mit der Ver-

bindung 1 erhält man die entsprechenden trihalogenmethylsubstituierten Adenosin-3',5'-cyclophosphate.

Durch Kondensation von Verbindung 1 mit verschiedenen Alkyl-, Aryl-, Aralkyl- und heterocyclischen Carboxaldehyden erhält man in der 2-Stellung substituierte 2,3-Dihydropurin-Zwischenprodukte, die in situ unter milden Bedingungen zu den entsprechenden in der 2-Stellung substituierten Adenin-Derivaten oxidiert werden. So erhält man beispielsweise unter Verwendung von n-Valeraldehyd nach einer Umsetzung von etwa 5 Minuten bis 1 Stunde in einer wäßrigen alkoholischen Lösung, wie Methanol oder Äthanol, unter Rückfluß in Gegenwart einer katalytischen Menge von Palladium-auf-Kohlenstoff 2-n-Butyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 5) in einer Ausbeute von annähernd 65 % d. Th. Praktisch unter den gleichen Bedingungen erhält man bei Verwendung von Isovaleraldehyd 2-(2-Methyl-1-propyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 6) bei Verwendung von Benzaldehyd 2-Phenyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 7) und bei Verwendung von Pyridin-2-carboxaldehyd 2-(2-Pyridyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 8).

Palladium-auf-Aktivkohle wird zwar bei der vorgenannten Reaktion als Katalysator bevorzugt, es können gegebenenfalls aber auch andere Katalysatoren verwendet werden, wie Platin oder Nickel. Die Reaktion kann auch bei niedrigeren Temperaturen, beispielsweise bei etwa 25°C, in zufriedenstellender Weise durchgeführt werden. Da aber zur Freisetzung des absorbierten Wasserstoffs vom Katalysator heftiges Rückflußkochen erforderlich ist, wird die Reaktion vorzugsweise unter Rückfluß durch-

geführt. Um die Verbindung 1 in Lösung zu bringen ist Wasser und eine Base nötig. Bestimmte Aldehyde sind aber in Wasser nicht löslich und außerdem wird die Verbindung 1 durch Wasser und die Base hydrolysiert, so daß die Verwendung eines wäßrigen Alkohols gemäß der vorstehenden Beschreibung bevorzugt wird.

Es kann auch erwünscht sein, bei Raumtemperatur zu arbeiten, da die Verbindung 1 bei den höheren Temperaturen, die bei Verwendung von Palladiumkatalysatoren notwendig sind, gegen Zersetzung empfindlich ist. Dementsprechend kann anstelle von Palladium ein Dehydrierungsmittel, wie Chloranil oder 2,3-Dichlor-5,6-dicyanobenzochinon verwendet werden, wobei beispielsweise Verbindung 9 als Reaktionsprodukt erhalten wird. Dieses Verfahren bietet außerdem den Vorteil, daß hohe Ausbeuten erhalten werden und daß die Produkte leicht zu isolieren sind. Aus diesem Grund ist dieses Verfahren besonders bevorzugt.

Die vorgenannte Reaktion kann auch bei anderen Temperaturen als bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Im allgemeinen läßt sich die Reaktion bei Temperaturen von etwa 0 bis 100°C durchführen. Bevorzugt ist ein Bereich von etwa 10 bis 40°C. Die Reaktion wird in einem Gemisch aus Wasser und organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, durchgeführt. Vorzugsweise wird 1 Teil Wasser auf 5 Teile organisches Lösungsmittel verwendet. Als organisches Lösungsmittel kann beispielsweise Dimethylformamid verwendet werden. Gegebenenfalls können aber auch andere mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel verwendet werden.

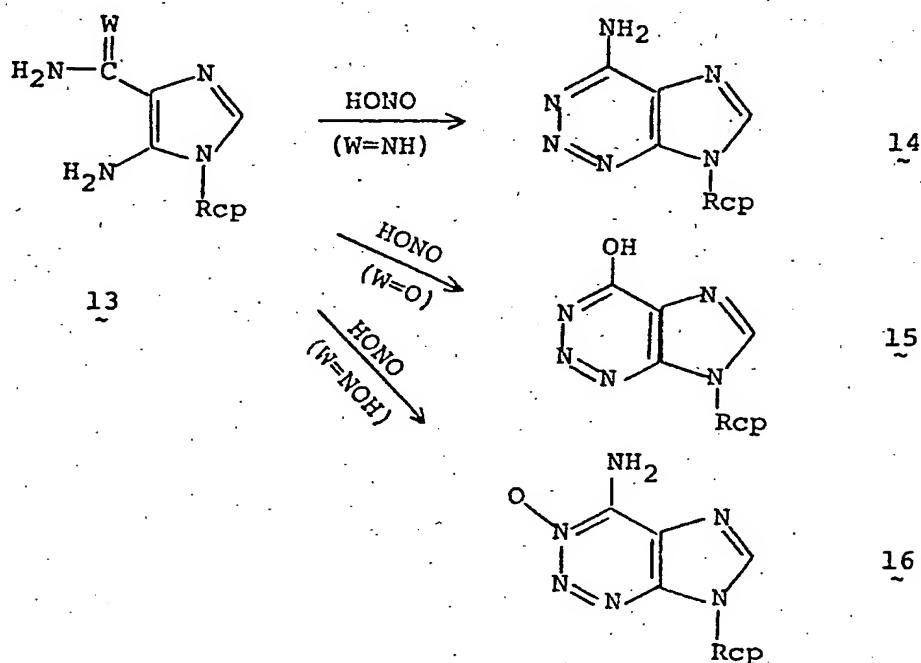
Die 2-Hydroxy- und 2-Thioderivate werden durch Umsetzung der Verbindung 1 mit geeignet aktivierten Carbonsäure- oder Thiocarbonsäurederivaten unter Wasserausschluß und unter Verwendung von Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel bei Temperaturen von etwa 0 bis 25°C hergestellt. Bei Verwendung von 1,1'-Carbonyl-bis-imidazol erhält man 2-Hydroxyadenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 10) und bei Verwendung von Thiocarbonyl-bis-imidazol erhält man 2-Thioadenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 11).

Die 2-Alkylthioderivate werden durch Alkylierung von Verbindung 11 mit Methyljodid oder einem anderen Alkyl- oder Aralkylhalogenid in wäßriger Natriumhydroxidlösung hergestellt. Man erhält das 2-Methylthioderivat (Verbindung 12) oder andere 2-Alkyl- oder Aralkylthioadenosin-3',5'-cyclophosphate. Die Umsetzung wird vorzugsweise etwa 30 Minuten bis 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Es können aber auch Temperaturen von etwa 0 bis 100°C angewendet werden.

Im folgenden Reaktionsschema B, in dem X ein Stickstoffatom oder ein N-Oxid und Y ein Stickstoffatom bedeutet, ist die Herstellung von 2-Azainosin- und Azadenosin-3',5'-cyclophosphaten erläutert. So erhält man durch Behandlung von 5-Amino-1-β-D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 13, in der W die HN=Gruppe bedeutet, d.h. also Verbindung 1 von Reaktionsschema A) mit Natriumnitrit unter stark sauren Bedingungen (beispielsweise in Gegenwart von HCl bei einem pH-Wert von höchstens 4) bei Temperaturen unter 0°C, vorzugsweise bei -25°C, erhält man 2-Azadenosin-3',5'-cyclophosphat

(Verbindung 14). Auf ähnliche Weise erhält man durch Behandlung von 5-Amino-1-β-D-ribofuranosylimidazol-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 13, in der W die O= oder HON=Gruppe bedeutet) unter den vorgenannten Bedingungen 2-Azainosin-3',5'-cyclophosphat bzw. 2-Azaadenosin-3',5'-cyclophosphat-1-N-oxid (Verbindungen 15 und 16).

Reaktionsschema B



Die Salze der Verbindungen der allgemeinen Formel I, beispielsweise die Ammonium-, Alkalimetall- oder Alkylaminsalze, erhält man durch Neutralisation der freien Nucleotide mit den entsprechenden Basen.

Die in der 2'-Stellung O-acylierten (beispielsweise C₁₋₁₆-Acyl-) Derivate erhält man durch Umsetzung der freien Nucleotide oder

deren Salze mit den entsprechenden Säureanhydriden oder Säurehalogeniden, wie Essigsäureanhydrid, Acetylchlorid, Propionylchlorid, Propionsäureanhydrid, Buttersäureanhydrid, Butyrylchlorid, Valerylchlorid, Valeriansäureanhydrid, Heptansäureanhydrid, Heptanoylchlorid, Hexanoylchlorid, Hexansäureanhydrid, Octanoylchlorid, Octansäureanhydrid, Palmitoylchlorid und Palmitinsäureanhydrid; vgl. die von Falbriard, et al. beschriebene allgemeine Synthese Biochim. et Biophys. Acta, Bd. 148 (1967), S. 99. Sutherland et al., Biochim. et Biophys. Acta, Bd. 148 (1967), S. 106, zeigten, daß die Acylierung von c-AMP die biologische Wirkung von c-AMP verstärkt wird, und zwar durch eine erhöhte Beständigkeit gegen die Hydrolyse durch Phosphodiesterasen und/oder zellulären Transport. Hoeksema et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, Bd. 6 (1961), S. 213 zeigten, daß das Absorptionsverhalten eines Nucleosids bei Menschen durch Acetylierung des Nucleosids verstärkt wird.

Die Verbindungen der Erfindung sind wertvolle Arzneistoffe. Die Erfindung betrifft daher auch Arzneipräparate, bestehend aus Verbindungen der allgemeinen Formel I und üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln und/oder Hilfsstoffen.

Bei einer Verabreichung der Verbindungen 3, 14 und 16 in Dosen von 25 mg/kg an frei laufende, spontan hypertensive Ratten zeigte sich eine signifikante 1- bis 10-stündige dämpfende Wirkung. Auf Grund von quantitativen und qualitativen in vivo-Untersuchungen an Ratten, die einen Hinweis auf eine Aktivität auf das Zentralnervensystem oder das autonome Nervensystem geben,

sowie Aussagen über die letale, analgetische und antimuricide Wirkung ergeben, wurde festgestellt, daß die Verbindungen 2, 14 und 16 bei intraperitonealer Verabreichung in 3 bis 5 Dosen von 25 bis 200 mg/kg eine leichte Aktivität sowie eine minimale letale Dosis von 200 mg/kg aufweisen. Die Verbindungen 2, 3 und 14 wurden außerdem daraufhin untersucht, inwieweit sie die Hydrolyse von c-AMP durch Katzenherzen-Phosphodiesterase hemmen. Alle drei Verbindungen zeigen deutliche Aktivität. Eine 50prozentige Hemmung des Enzyms ergibt sich bei Wirkstoffkonzentrationen von 0,39, 1,4 bzw. 2,7 µm. Die Verbindungen 2, 5, 14 und 16 bewirken bei einer Verabfolgung von 50 mg/kg an Ratten eine signifikante Blutdrucksenkung. Ebenso bewirkt Verbindung 11 bei einer Konzentration von 50 mg/kg bei Ratten eine Blutdrucksenkung.

Die Beispiele erläutern die Erfindung. Teil- oder Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf das Gewicht.

2405895

Herstellung von Verbindung 1

Beispiel A:

1-Methoxyadenosin-3,5-cyclophosphat

76,5 g, (0.200 Mol) Adenosin-3,5-cyclophosphat-N¹-oxid (als Dihydrat) werden in einer Lösung von 400 ml Dimethylsulfoxid und 31 g (0.204 Mol) 1,5-Diazabicyclo-[5.4.0] -undec-5-en gelöst. Die Lösung wird auf 15°C gekühlt und bei Raumtemperatur unter Rühren mit 40 ml Methyliodid versetzt. Nach 30 Minuten ist das Gemisch geliert. 1,5 Liter Äthanol werden zugegeben, und der Feststoff wird durch heftiges Rühren gründlich homogenisiert. Sodann wird der Feststoff abfiltriert und die erhaltene Paste in 2 Liter Äthanol resuspendiert und schliesslich homogenisiert. Anschliessend wird das Produkt abfiltriert, mit Äthanol und Diäthyläther gewaschen und getrocknet. Man erhält 80,4 g des vorgenannten Zwischenprodukts. Durch Ausfällen einer wässrigen Methanollösung des Produkts mit Diäthyläther erhält man eine Analysenprobe.

$C_{11}H_{14}N_5O_7P \cdot 1/2H_2O$	C	H	N
ber.:	35,88 %	4,11 %	19,02 %
gef.:	35,88 %	4,46 %	18,69 %

Beispiel B:

5-Amino-N-methoxy-1-β-D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin-3,5-cyclophosphat und 6-Methoxyamino-9-β-D-ribofuranosylpurin-3,5-cyclophosphat

Eine Lösung von 30 g (81,5 Mol) 1-Methoxyadenosin-3,5-cyclophosphat und 20 g NaHCO₃ (239 mMol) in 300 ml H₂O wird 45 Minuten unter Rückfluss erwärmt. Der pH-Wert der Lösung wird mit Dowex 50 x 8 (H⁺-Form) auf 2,5 eingestellt, und das CO₂ unter Erwärmen mittels einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Sodann wird der pH-Wert mit NaOH wieder auf 9 bis 10 eingestellt und das Harz abfiltriert.

409835/1030

2405895

Die erhaltene Lösung wird über eine mit 400 ml Dowex 1 x 2 (Formiat Form, Korngrösse 74 - 149 μ) beschickte Säule gegeben. Die Säule wird gründlich mit Wasser gewaschen und anschliessend mit einem Ameisensäuregradienten eluiert, wobei sich im Mischgefäss 4 Liter Wasser und im Vorratsbehälter 4 Liter 4 n Ameisensäure befinden. Nach dem Entstehen von etwa 2 Liter Eluat erscheint das erste Hauptprodukt. Die entsprechende Lösung wird eingedampft und der Rückstand mit Äthanol digeriert. Man erhält 5,4 g (19 % d.Th.) Produkt. Nach Umkristallisation aus Wasser erhält man eine Analysenprobe.

$C_{10}H_{16}N_5O_7P$	C	H	N
ber.:	34,39 %	4,58 %	20,05 %
gef.:	34,54 %	4,70 %	19,96 %

Nach etwa weiteren 6 Litern Eluat erscheint das zweite Hauptprodukt. Nach dem Eindampfen der entsprechenden Fraktionen und nach Ausfällen aus einer wässrigen Methanollösung mit Diäthyläther erhält man 14,6 g (49 % d.Th.) der zweiten Titelverbindung.

$C_{11}H_{14}N_5O_7P \cdot 1/2 H_2O$	C	H	N
ber.:	35,88 %	4,11 %	19,02 %
gef.:	35,64 %	4,09 %	18,71 %

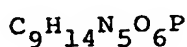
Beispiel C:

5-Amino-1- β -D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin-3,5-cyclophosphat

Eine Lösung von 5,0 g (14,3 mmol) 5-Amino-N-methoxy-1- β -D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin-3,5-cyclophosphat in 200 ml H_2O wird auf 60°C vorerwärmt und nach Zusatz von etwa 5 g feuchtem Mittelschwamm-Katalysator 2 Stunden bei einem H_2 -Druck von 2 bis 3 atm bei 60°C geschüttelt. Anschliessend wird die Lösung filtriert und zur Trockene eingedampft. Man erhält 3,75 g (82 % d.Th.) der Titelverbindung. Nach Umkristallisation aus H_2O erhält man eine

409835/1030

Analysenprobe.



	C	H	N
ber.:	33,86 %	4,42 %	21,94 %
gef.:	33,53 %	4,63 %	21,77 %

B e i s p i e l 1

2-Methyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 2)

Ein Gemisch aus 3,0 g (9,4 mMol) Verbindung 1, 2,0 g (13 mMol) 1,5-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-5-en (DBU) und 20 ml Dimethylsulfoxid wird erwärmt, bis die einzelnen Bestandteile in Lösung gehen, und anschließend mit 3 ml Triäthylorthoacetat versetzt. Die Lösung wird in einem Ölbad von 150°C 45 Minuten gerührt. Die heiße Lösung wird sodann in 100 ml H₂O und 1 ml Ameisensäure eingegossen. Die erhaltene Lösung wird über eine mit Dowex 1 x 2 (Formiatform, Korngrösse 74 - 149 µ) beschickte Säule der Abmessungen 2,6 x 20 cm gegeben. Nach dem

Waschen mit H_2O wird die Säule mit einem Ameisensäuregradienten eluiert, wobei sich in der Mischkammer 2 Liter H_2O und im Vorratsbehälter 2 Liter 5 n Ameisensäure befinden. Nach dem Eindampfen der entsprechenden Fraktionen erhält man 2,52 g (75 % d. Th.) Produkt.

$C_{11}H_{14}N_5O_6P.H_2O:$	C	H	N
ber.:	36,57 %	4,46 %	19,39 %
gef.:	36,90 %	4,54 %	19,69 %.

Beispiel 2

2-Äthyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 3)

Durch Behandlung von 0,50 g (15,7 mMol) der Verbindung 1 mit Triäthylorthopropionat gemäß Beispiel 1 erhält man nach der Ionenaustauschchromatographie 0,390 g (66 % d. Th.) der Verbindung 3.

$C_{12}H_{16}N_5O_6P.H_2O:$	C	H	N
ber.:	38,40 %	4,84 %	18,66 %
gef.:	38,57 %	4,73 %	18,77 %.

Beispiel 3

2-Trifluormethyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 4)

Ein Gemisch aus 1,0 g (3,14 mMol) der Verbindung 1, 0,4 g (3,22 mMol) 1,5-Diazabicyclo-[4.3.0]-non-5-en (DBN) und 3,0 g Trifluoracetamid wird in einem Ölbad auf $135^{\circ}C$ erwärmt und 30 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 5 ml Tetramethylharnstoff wird das Gemisch 4 Stunden gerührt und erwärmt und sodann in 100 ml Diäthyläther gegossen. Die überstehende Flüssigkeit wird abdekantiert und der Rückstand in 50 ml H_2O aufgenommen, über eine mit Dowex 50 x 8 (H^+ -Form, Korngrösse 74 - 149 μ)

2405895

beschickte Säule der Abmessungen 2,6 x 20 cm gegeben und mit H_2O gewaschen. Di ersten 500 ml des Eluats werden zur Trockene eingedampft, und der Rückstand wird in 20 ml Äthanol aufgenommen. Die Lösung wird mit 40 ml Essigsäureäthylester verdünnt und abfiltriert. Beim Stehenlassen scheiden sich 0,59 g (47 % d. Th.) Produkt ab.

$C_{11}H_{10}F_3N_5O_6P$:	C	H	F	N
ber.:	33,34 %	2,54 %	14,39 %	17,68 %
gef.:	33,31 %	2,71 %	14,67 %	17,45 %

B e i s p i e l 4

2-n-Butyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 5)

Ein Gemisch aus 4,0 g (12,5 mMol) von Verbindung 1, 2,0 g (13,0 mMol) DBU, 30 ml H_2O und 40 ml Äthanol wird durch 5minütiges Rückflußkochen in Lösung gebracht. Anschließend werden 0,50 g Palladium-auf-Aktivkohle (10 Prozent Palladium) und eine Lösung von 3,0 ml (28,2 mMol) n-Valeraldehyd in 25 ml Äthanol unter Rückflußkochen zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Rückflußkochen wird das Gemisch abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen, abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird wieder in Methanol aufgenommen, abfiltriert und eingedampft. Sodann wird der Rückstand in 200 ml H_2O aufgenommen und über eine mit Dowex 1 x 2 (Formiatform, Korngrösse 74 - 149 μ) beschickte Säule der Abmessungen 16 x 4 cm gegeben. Nach dem Waschen mit H_2O wird die Säule mit einem Ameisensäuregradienten eluiert, wobei sich in der Mischkammer 2 Liter H_2O und im Vorabsbehälter 3 n Ameisensäure befinden. Es werden Fraktionen mit jeweils 23 ml Volumen gesammelt. Nach dem Eindampfen der

409835/1030

Fractionen 47 bis 85 erhält man einen Rückstand, der nach Zugabe von Äthanol kristallisiert. Man erhält 3,35 g (65 % d. Th.) Produkt.

$C_{14}H_{20}N_5O_6P \cdot 1,5H_2O$:	C	H	N
ber.:	40,78 %	5,62 %	16,99 %
gef.:	41,05 %	5,68 %	17,08 %

Beispiel 5

2-(2-Methyl-1-propyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 6)

2 ml Isovaleraldehyd werden tropfenweise zu einem unter Rückfluß gehaltenem Gemisch von 3,2 g (10 mMol) von Verbindung 1, 1,60 g (10,4 mMol) DEU, 15 ml Äthanol, 15 ml H_2O und 0,5 g Palladium-auf-Aktivkohle (10 Prozent Palladium) gegeben. Nach 1stündigem, weiterem Rückflußkochen wird das Gemisch gemäß Beispiel 4 aufgearbeitet. Man erhält 2,18 g (54 % d. Th.) Produkt.

$C_{14}H_{20}N_5O_6P \cdot H_2O$:	C	H	N
ber.:	41,69 %	5,50 %	17,37 %
gef.:	41,68 %	5,65 %	17,64 %

Beispiel 6

2-Phenyladenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 7)

Ein Gemisch aus 2,0 g (6,3 mMol) von Verbindung 1, 0,7 g (7 mMol) Triäthylamin, 0,30 g Palladium-auf-Aktivkohle (10 Prozent Palladium), 0,8 ml (7,9 mMol) Benzaldehyd und 30 ml 50prozentigem wäßrigem Äthanol wird 16 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die filtrierte Lösung wird eingedampft und der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Durch Einstellen des

pH-Wertes auf 2,0 mit Salzsäure wird das Produkt zum Kristallisieren gebracht. Man erhält 0,55 g (20 % d. Th.) Produkt.

$C_{16}H_{16}N_5O_6P \cdot H_2O$:	C	H	N
ber.:	45,39 %	4,29 %	16,55 %
gef.:	45,43 %	4,38 %	16,57 %.

Beispiel 7

2-(2-Pyridyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 8)

Ein Gemisch aus 0,32 g (1 mMol) von Verbindung 1, 0,154 g (1 mMol) DBU, 10 ml H_2O , 10 ml Methanol, 0,100 g Palladium-auf-Aktivkohle (10 Prozent Palladium) und 1,28 g (1,2 mMol) Pyridin-2-carboxaldehyd wird 1 Stunde unter Rückfluß gekocht, anschließend abfiltriert und eingedampft. Nach dem Einstellen des pH-Wertes der Lösung auf 2 erhält man Kristalle. Diese werden aus H_2O umkristallisiert. Man erhält 0,270 g (66 % d. Th.) von Verbindung 8.

$C_{15}H_{15}N_6O_6P$:	C	H	N
ber.:	44,34 %	3,72 %	20,69 %
gef.:	44,42 %	4,32 %	20,43 %.

Beispiel 8

2-(2-Chlorphenyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 9)

Eine Lösung von 1,0 g (3 mMol) 5-Amino-1- β -D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 1), 1,5 ml 2 n NaOH, 5 ml H_2O , 15 ml Dimethylformamid und 1 ml o-Chlorbenzaldehyd wird 3 Stunden gerührt und anschließend mit einer Lösung von 1 g Chloranil in 10 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 1-stündigem weiterem Rühren wird die Lösung eingedampft und zwischen 100 ml Essigsäureäthylester und 100 ml Wasser verteilt. Die wäßrige Phase wird mit 100 ml Äthanol verdünnt und

über eine mit 150 ml Dowex 50 x 2 (H^+ -Form, Korngröße 74 - 149 μ) gegeben. Die Säule wird mit einer 50prozentigen wäßrigen Methanollösung eluiert. Nach dem Eindampfen der das Produkt enthaltenden Fraktionen und Ausfällen aus wäßrigem Äthanol mit Diäthyläther erhält man 1,06 g (81 % d. Th.) Produkt.

Beispiel 9

2-Hydroxyadenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 10)

Ein Gemisch aus 2,0 g (6,3 mMol) von Verbindung 1, 0,80 g (6,45 mMol) DBN und 10 ml Dimethylsulfoxid wird unter Erwärmen in Lösung gebracht. Die Lösung wird bei 25°C unter Rühren mit 1,0 g (6,2 mMol) 1,1'-Carbonyldiimidazol versetzt. Nach 30 minütigem Rühren werden weitere 1,0 g 1,1'-Carbonyldiimidazol zugegeben und sodann nochmals 30 Minuten gerührt. Die Lösung wird mit 50 ml H_2O und 1 ml Ameisensäure verdünnt und über eine mit Dowex 1 x 2 (Formiatform, Korngröße 74-149 μ) beschickte Säule der Abmessungen 2,6 x 10 cm gegeben. Nach dem Waschen mit H_2O wird die Säule mit einem Ameisensäuregradienten eluiert, wobei sich in der Mischkammer 1 Liter H_2O und im Vorratsbehälter 1 Liter 5 n Ameisensäure befinden. Die das Produkt enthaltende Fraktion (Eluatvolumen 750 bis 1250 ml) wird zu 0,79 g (33 % d. Th.) Produkt eingedampft.

$C_{10}H_{12}N_5O_7P \cdot 2H_2O$:	C	H	N
ber.:	31,50 %	4,23 %	18,37 %
gef.:	31,42 %	4,29 %	18,44 %

Beispiel 10

2-Thioadenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 11)

Ein Gemisch aus 3,6 g (11,3 mMol) von Verbindung 1, 1,60 g (10,5 mMol) DBU und 50 ^{mMol} Dimethylsulfoxid wird unter Erwärmen in Lösung gebracht und sodann auf 0°C abgekühlt. Unter Rühren werden 2,0 g (11,3 mMol) 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol zugegeben. Nach 10minütigem Rühren wird die Lösung 20 Stunden bei -20°C stehengelassen und sodann mit weiteren 1,0 g 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol versetzt. Nach weiterem 30minütigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 100 ml H₂O und 1 ml Ameisensäure verdünnt und sodann über eine mit Dowex 1 x 2 (Formiatform, Korngröße 74-149 µ) beschickte Säule der Abmessungen 2,6 x 20 cm gegeben. Die Säule wird mit H₂O gewaschen und anschließend mit einem Ameisensäuregradienten eluiert, wobei sich im Vorratsbehälter 900 ml 1 n Ameisensäure befinden. Das Produkt erscheint gegen Ende. Die Elution wird mit 1 n Ameisensäure und 2 n Ammoniumformiat vervollständigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden über eine mit 1 Liter Dowex 50 x 8 (H⁺-Form, Korngröße 74-149 µ) beschickte Säule gegeben. Nach dem Eindampfen des Eluats zur Trockene erhält man 2,05 g (48 % d. Th.) Produkt.

C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ PS H ₂ O:	C	H	N
ber.:	31,58 %	3,71 %	18,42 %
gef.:	31,87 %	3,59 %	18,58 %

Beispiel 11

2-Methylthioadenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 12)

Ein Gemisch aus 1,8 g (4,5 mMol) von Verbindung 10, 5 ml 2 n NaOH, 2 ml Methyljodid, 20 ml H₂O und 20 ml Methanol wird

2 Stunden gerührt. Die Lösung wird unter vermindertem Druck eingedampft, in 100 ml H₂O aufgenommen und schließlich über eine mit 50 ml Dowex 1 x 2 (Formiatform, Korngröße 74-149 μ) gegeben. Das Produkt erscheint als Hauptkomponente nach Elution mit einem Ameisensäuregradienten, wobei sich in der Mischkammer 1 Liter 1 n Ameisensäure und im Vorratsbehälter 1 Liter 5 n Ameisensäure befinden. Um die in Spuren vorhandenen Verunreinigungen zu entfernen, wird das nach dem Eindampfen der vorgenannten Fraktionen erhaltene Produkt in Wasser aufgenommen und über eine mit 200 ml Dowex 50 x 2 (H⁺-Form, Korngröße 74 - 149 μ)

besockte Säule gegeben, die mit 500 ml Wasser und anschließend mit 1 Liter 0,5 n Ameisensäure gewaschen wird. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden eingedampft. Man erhält 0,64 g (38 % d. Th.) Produkt.

C ₁₁ H ₁₄ N ₅ O ₆ PS.1-1/2H ₂ O:	C	H	N
ber.:	32,84 %	4,26 %	17,41 %
gef.:	32,98 %	4,57 %	17,49 %

Die im UV-Spektrum auftretenden Banden der gemäß Beispiel 1 bis 10 erhaltenen Verbindungen sind in Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I

UV-Spektrum der Verbindungen 2 bis 11

Ver- bindung Nr.	Substituent in der 2-Stellung	λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$)		
		pH-Wert 1	pH-Wert 7	pH-Wert 11
2	-CH ₃	256 (13,5)		261 (14,4)
3	-C ₂ H ₅	256 (13,9)		261 (15,0)
4	-CP ₃	258 (12,9)		258 (13,3)
7	-C ₆ H ₅	270 (16,5)		238 (24,3)
		287 sh(13,7)		268 sh(14,4)
5	- <u>n</u> -C ₄ H ₉	257 (14,5)		261 (15,6)
6	- <u>i</u> -C ₄ H ₉	257 (14,9)		261 (15,1)
8	-2-C ₅ H ₄ N	232 (16,7)		231 (22,4)
		263 (12,4)		261 (13,6)
		329 (8,6)		294 (10,4)
9	-OH	234 (6,7)	247 (9,6)	252 (7,3)
		280 (12,7)	292 (11,9)	283 (10,9)
10	-SH	231 (15,1)	229 (16,4)	241 (21,4)
		288 (21,6)	286 (20,6)	283 (16,7)
11	-SCH ₃	268 (16,7)		234 (21,8)
				272 (14,7)

B e i s p i e l 12

2-Azaadenosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 14)

1,5 g (4,2 mMol) 5-Amino-1-β-D-ribofuranosylimidazol-4-carboximidin-3',5'-cyclophosphat werden bei -25°C in 92 ml 6 n Salzsäure gelöst. Die Lösung wird unter Rühren innerhalb von 25 Minuten mit einer Lösung von 370 mg (6,2 mMol) Natriumnitrit in 14 ml Wasser versetzt. Die erhaltene Lösung wird weitere 40 Minuten bei -25°C gerührt und mit 30 ml Äthanol versetzt. Der pH-Wert der Lösung wird mit konzentrierter Ammoniaklösung auf 7 eingestellt. Sodann wird die Lösung langsam auf 0°C erwärmt. Die anorganischen Salze werden abfiltriert. Das Filtrat wird über eine mit Dowex 50 (H⁺-Form, Korngröße 74-149 μ) beschickte Säule der Abmessungen 5,5 x 46 cm gegeben. Die Säule wird zur Abtrennung von Verunreinigungen und anschließend zur Gewinnung des Produktes mit Wasser gewaschen. Nach dem Eindampfen der entsprechenden Fraktionen unter Zusatz von Äthanol und nach dem Abfiltrierten erhält man 1,19 g 2-Azaadenosin-3',5'-cyclophosphat (über P₂O₅ bei 78°C unter Hochvakuum 18 Stunden getrocknet).

C ₉ H ₁₁ N ₆ O ₆ P:	C	H	N
ber.:	32,73 %	3,35 %	25,45 %
gef.:	32,54 %	3,47 %	25,23 %

$\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 1}$ 252 nm (ε 7100), 281 nm (ε 3400)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 11}$ 255 nm (ε 7100), 296 nm (ε 5200)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ wie bei pH 11.

B e i s p i e l 13

2-Azainosin-3',5'-cyclophosphat (Verbindung 15)

338 mg (1 mMol) 5-Amino-1-β-D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamid-3',5'-cyclophosphat werden bei -25°C in 20 ml 6 n Salzsäure gelöst. Die Lösung wird innerhalb von 10 Minuten unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 30 mg (1,15 mMol) Natriumnitrid in 3 ml Wasser versetzt. Sodann wird die Lösung weitere 30 Minuten bei -30°C gerührt und mit 20 ml Äthanol versetzt. Der pH-Wert der Lösung wird mit konzentrierter Ammoniaklösung auf 7 eingestellt. Sodann wird die Lösung über eine mit Dowex 50 (H⁺-Form, Korngröße 74-149 μ) beschickte Säule der Abmessungen 3 x 20 cm gegeben. Nach Elution der Säule mit Wasser und Eindampfen der entsprechenden Fraktionen erhält man ein halbfestes Produkt, das aus Äthanol kristallisiert. Man erhält 160 mg 2-Azainosin-3',5'-cyclophosphat · 1/2 H₂O (nach Trocknen über P₂O₅ bei 78°C unter Hochvakuum).

C ₉ H ₁₀ N ₅ O ₇ P 1/2 H ₂ O:	C	H	N
ber.:	31,77 %	3,25 %	20,5 %
gef.:	31,79 %	3,23 %	20,55%

$\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 1}$ 206 nm (ε 15 400), 237 sh (ε 5400), 285 nm (ε 7500), 337 nm (ε 1000)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 11}$ 247 nm (ε 5400), 292 nm (ε 5900) 330 sh (ε 1000).

B e i s p i e l 14

2-Azaadenosin-3',5'-cyclophosphat-N¹-oxid (Verbindung 16)

(15 mMole)

5 g 5-Amino-1-β-D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidoxim-3',5'-cyclophosphat werden bei -30°C in 50 ml 6 n Salzsäure gelöst.

Die Lösung wird innerhalb von 10 Minuten tropfenweise mit einer

Lösung von 1,14 g (16,5 mMol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser versetzt. Die erhaltene Lösung wird weitere 30 Minuten bei -30°C gerührt und anschließend mit 20 ml Äthanol versetzt. Der pH-Wert der Lösung wird sodann mit konzentrierter Ammoniaklösung auf 7 eingestellt. Sodann wird die Lösung mit Dowex 50 (H^{+} -Form, Korngröße 74-149 μ) entsalzt und zusammen mit Äthanol eingedampft und filtriert. Man erhält 2,0 g 2-Azaadenosin-3', 5'-cyclophosphat-monohydrat (nach 12stündigem Trocknen über P_2O_5 bei 78°C unter Hochvakuum).

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_6\text{O}_7\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$:	C	H	N
ber.:	29,68 %	3,59 %	23,07 %
gef.:	29,51 %	3,42 %	22,80 %.

$\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 1}$ 222 nm (ϵ 25 400), 243 nm (ϵ 14 700), 270 sh nm (ϵ 4700)
327 nm (ϵ 5800)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{pH } 11}$ 227 nm (ϵ 17 700), 245 nm (ϵ 13 100), 270 sh nm (ϵ 4200)
350 nm (ϵ 5100)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 222 nm (ϵ 25 600), 244 nm (ϵ 15 600), 270 sh nm (ϵ 4700)
347 nm (ϵ 5500).

Beispiel 15

Hemmung von Phosphodiesterase

3',5'-c-AMP-Phosphodiesterase (PDE) wird auf folgende Weise aus verschiedenen Geweben isoliert und gereinigt. Es werden Homogenate von Lunge und Leber von Kaninchen und von Rinderherz in Saccharose-Tris-Magnesium-Puffer hergestellt und zur Entfernung von Zellkernen und Zelltrümmern bei niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Überstände werden anschließend 30 Minuten bei 105 000 x g zentrifugiert. Die bei 105 000 x g erhaltenen

409835/1030

Überstände werden sodann mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraktioniert. Der Niederschlag, der bei 0 bis 30prozentiger Sättigung gebildet wird, wird bei 20 000x g abzentrifugiert und in Tris-Magnesium-Puffer gelöst. Sodann wird über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Eine zweite Ammoniumsulfatfraktion wird durch Erhöhen der Salzkonzentration im ersten Überstand auf 50 % erhalten. Diese beiden Ammoniumsulfatfraktionen sowie der bei 30 bis 50prozentiger Sättigung erhaltene Überstand werden anschließend auf ihre PDE-Aktivität nach dem Verfahren von Appleman, Biochemistry, Bd. 10, (1971), S. 311, untersucht. Die erste Fraktion aus dem Lungen- und Nierengewebe weist eine geringe Affinität für 3',5'-c-AMP auf (hohe K_m). Die zweite Fraktion zeigt im Lineweaver-Burk-Diagramm einen biphasischen Verlauf. Das deutet entweder auf die Anwesenheit von zwei getrennten Enzymen, von denen eines eine hohe und das andere eine geringe Affinität aufweist oder auf ein Protein mit zwei getrennten aktiven Zentren hin. Appleman (a.a.O.) gibt an, daß man aus Gehirnextrakten zwei getrennte Enzyme (eine hohe K_m und eine niedrige K_m) erhält, die chromatographisch an Sepharosegel getrennt werden können.

Sämtliche Hemmversuche werden mit dem Enzym hoher Affinität (Fraktion II, niedrige K_m) aus Lunge und Niere von Kaninchen oder Rinderherz durchgeführt. Die I_{50} -Werte werden in einigen Fällen aus einem Diagramm von $\log I$ gegen Prozent I bei den Untersuchungen berechnet, bei dem die InhibitorKonzentration über einen weiten Bereich schwankt. Die Konzentration von 3',5'-c-AMP ist dabei konstant und beträgt etwa $1,7 \times 10^{-7}$ m. Die relative Inhibitoraktivität jeder Verbindung, bezogen auf

Theophyllin, wird als α -Wert angegeben. Dieser Wert wird erhalten, indem man den I_{50} -Wert von Theophyllin durch den I_{50} -Wert der einzelnen Verbindungen dividiert. In den meisten Fällen werden die α -Werte aus einem Hemmversuch bei einer einzigen Konzentration der zu untersuchenden Verbindung berechnet, und zwar immer dann, wenn die bei dieser Konzentration hervorgerufene Hemmung im Bereich von 20 bis 80 Prozent liegt. In diesen Fällen werden die α -Werte durch Division der Theophyllinkonzentration, die zum Hemmgrad X Prozent führt durch die Konzentration der zu untersuchenden Verbindung, die zum gleichen Hemmgrad X Prozent führt, berechnet.

Die Richtigkeit dieser Methode wird nachgeprüft, indem die durch Messung bei einer einzigen Inhibitorkonzentration erhaltenen Werte (1) und die Werte, die bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (I_{50} -Bestimmungen) (2) verglichen werden. Die auf diese Weise erhaltenen α -Werte weichen um nicht mehr als 10 Prozent voneinander ab.

Das basische Inkubationsgemisch enthält folgende Bestandteile (Mengenangaben in mMol): 0,0016 ^3H -c-AMP (spezifische Aktivität etwa 2180 cpm/pMol); 40 Tris vom pH-Wert 7,5; 0,5 MgCl_2 ; Enzym (c-AMP-Phosphodiesterase) 5 bis 50 μg Protein; und Inhibitor in einer Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-6} m. Es wird 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Am Ende der Inkubation wird das Gemisch 2 Minuten auf 90°C erwärmt und mit 100 μg Schlangengift-Phosphodiesterase aus *Crotalus atrox* versetzt. Die Ansätze werden 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Sodann wird das Gemisch abgekühlt und mit 1 ml einer Dowex 1-2X (Korngröße 74 - 149 μ)

Suspension, die durch Vermischen von 100 g Harz und 200 g H₂O hergestellt ist, versetzt. Dieses Gemisch wird zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wird zur Bestimmung der Impulse pro Minute im Flüssigkeitsscintillationszähler verwendet. Die Nullwerte werden aus Ansätzen bestimmt, bei denen die erste Inkubation ohne c-AMP-Phosphodiesterase durchgeführt wird.

Die Ergebnisse der Hemmversuche sind in Tabelle II aufgeführt.

B e i s p i e l 16

Aktivierung von Proteinkinase aus Rinderhirn

Von c-AMP abhängige Proteinkinase wird gemäß Miyamoto et al., J. Biol. Chem., Bd. 244 (1969) S. 6395 bis zur Chromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt. Die Aktivität der Proteinkinase wird durch Messen des ³²P-Phosphateinbaus (in Histon) aus γ -³²P-markiertem ATP bestimmt. Das Inkubationsgemisch enthält folgende Bestandteile (Mengenangaben in μ Mol): 10 Natrium-glycerin-Phosphatpuffer vom pH-Wert 6; 0,001 γ -³²P-ATP (etwa 2×10^6 cpm); 2 Magnesiumacetat; 2 Natriumfluorid; 0,06 Äthylendiamintetraessigsäure; 40 bis 400 μ g Histon, die angegebene Menge an c-AMP, c-GMP oder deren Derivat; 5 bis 25 μ g gereinigte Proteinkinase; Gesamtvolumen $\sqrt{0,2}$ ml. Die Aktivitätskonstanten (K_a) werden gemäß dem Verfahren von Muncyama et al., Biochemistry Bd. 10 (1971), S. 2390 bestimmt. In Tabelle II ist das Verhältnis der K_a -Werte zu den entsprechenden Werten von c-AMP (K_a') angegeben.

2405895

B i s p i e l 17

NACHGEHT

Beständigkeit gegen den Abbau durch Phosphodiesterase (PDE)

Die c-AMP-Phosphodiesterasen werden aus Gewebehomogenaten von Kaninchennieren, und zwar durch Ammoniumsulfatfällung der bei 100 000x g erhaltenen Überstände. Die Eignung der c-AMP-Derivate als Substrate für die CAMP-Phosphodiesterase wird nach dem Verfahren von Muncyama et. al. (a.a.O.) festgestellt. Das nach Behandlung des c-AMP-Derivats mit PDE aus dem 5'-Monophosphat freigesetzte anorganische Phosphat wird colorimetrisch bestimmt. Die Freisetzung des anorganischen Phosphats wird durch 5'-Nucleotidase aus Schlangengift oder durch alkalische Phosphatase aus E. coli durchgeführt. Das basische Gemisch enthält folgende Bestandteile (Mengenangaben in μMol): 40 Tris-Puffer vom pH-Wert 7,5; 25 Magnesiumacetat; 0,1 c-AMP oder dessen Derivat; 100 bis 500 μg Enzym; Gesamtvolumen 1,0 ml. Eine Einheit der Enzymaktivität wird als die Enzymmenge definiert, die bei 37°C innerhalb von 10 Minuten die Hydrolyse von 1,0 μMol katalysiert. In Tabelle II ist das Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten der c-AMP-Derivate zum c-AMP angegeben (a).

B e i s p i e l 18

Aktivierung der Steroidsynthese in der Nebenniere

Nach dem allgemeinen Verfahren von Kloppenborg et al., Endocrinology, Bd. 82 (1968), S. 1053 werden Suspensionen von Nebennierenzellen der Ratte hergestellt. Entkapselte Viertel von Nebennieren von männlichen Sprague-Dawley-Ratten werden in einem Krebs-Ringer-Bicarbonat-Albumin-Glucose-Puffer (KRBAG) vom pH-Wert 7,4 suspendiert. Dieser Puffer wird nach den Anga-

409835/1030

ben von DeLuca and Cohen in "Manometric Techniques" (1964), 4. Auflage, herausgegeben von W.W. Umbreit, R.H. Burris und J.F. Stauffer, Minneapolis, Minn., Burgess, S. 132 bis 133, hergestellt. Der Puffer enthält 3 g/100 ml Rinderalbumin und 0,2 g/100 ml Glucose. 32 in Viertel aufgeteilte Nebennieren in 10 ml KRBAG werden mit 5 mg/ml Kollagenase versetzt. Das Gewebe wird 1 Stunde bei 35°C unter einer Atmosphäre aus 95 Prozent Sauerstoff und 5 Prozent Kohlendioxid in einem Schüttelbad bei 120 Schüttelbewegungen/Minute digeriert. Nach dem Digerieren wird das Gewebe durch wiederholtes Durchlaufen einer Pasteurpipette leicht dispergiert. Die suspendierten Zellen werden bei 4°C 10 Minuten bei 480 g zentrifugiert, zweimal gewaschen und im ursprünglichen Volumen KRBAG nochmals zentrifugiert. Die gewaschenen Zellteilchen werden anschließend in KRBAG (1 Nebenniere/ml) resuspendiert und durch ein Sieb aus korrosionsbeständigem Stahl mit Porenöffnungen von 0,2 mm Durchmesser filtriert, um alle großen nicht-digerierten Gewebeteilchen zu entfernen.

Die Inkubation wird 2 Stunden bei 35°C unter einer Atmosphäre von 95 Prozent Sauerstoff und 5 Prozent Kohlendioxid durchgeführt. Jeweils 2,5 ml Inkubationsgemisch enthalten 1 ml Suspension von Nebennierenzellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt.

B e i s p i e l 19

Bestimmung der Adenylcyclase-Aktivität

Alveolares Lungengewebe wird aus normalen Meerschweinchen gewonnen. Das Gewebe wird zerkleinert und unter Verwendung eines

409835/1030

Duall-Gewebezerkleinerers zu einem 20prozentigem Homogenat in einer gekühlten Pufferlösung verarbeitet. Der Puffer enthält ^{millimolar} 1 \checkmark MgCl_2 und ^{millimolar} 2 \checkmark Glycylglycin und weist einen pH-Wert von 7,5 auf; F. Murad et. al., J. Biol. Chem., Bd. 237 (1962), S. 1233. Das Homogenat wird durch vier Gazelagen filtriert und 15 Minuten bei 4°C und 1000x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wird im Puffer resuspendiert. Anteile von 0,5 bis 1,0 ml Volumen werden in Ampullen verschlossen und unter Stickstoff für eine spätere Bestimmung der Adenylcyclase-Aktivität aufbewahrt. Die auf diese Weise gelagerten Proben behalten 3 Monate lang ihre unverminderte Aktivität bei. Die Proteinbestimmung wird nach dem Verfahren von Lowry et al., J. Biol. Chem., Bd. 193 (1951) S. 265, unter Verwendung von kristallinem Rinderserum-Albumin als Standard bestimmt.

Die Adenylcyclase-Aktivität wird zweifach nach bekannten Verfahren bestimmt; vgl. G. Krishna et al., J. Pharmacol. Exp. Therap., Bd. 163 (1968), S. 379; G.S. Levey und S.E. Epstein, Circ. Res., Bd. 24 (1969), S.151. Das Gesamtvolumen zur Bestimmung beträgt 0,59 ml und ist ^{millimolar} 1,8 \checkmark an MgCl_2 , ^{millimolar} 0,8 \checkmark an Glycylglycin, ^{millimolar} 32 \checkmark an Tris (pH-Wert 7,8), ^{millimolar} 1,2 \checkmark an ATP ($3-5 \times 10^6$ cpm [α - ^{32}P]/ATP) und ^{enthält} 100 bis 150 μg der besonderen Enzymfraktion (Lungenprotein). Konzentrierte Lösungen der zu untersuchenden Verbindungen werden täglich frisch durch Auflösen in Wasser, Äthanol oder Dimethylsulfoxid hergestellt. Je nach der gewünschten Endkonzentration werden 5 bis 10 μl dieser Lösungen zum Inkubationsgemisch gegeben.

Das Inkubationsgemisch wird in einem Schüttler 15 Minuten bei 37°C umgesetzt und anschließend zur Inaktivierung der Adenylcyclase 3 Minuten gekocht. Sodann werden 100 µl einer 4 µMol ATP, 1,25 µMol c-AMP und 0,15 µCi [^3H] c-AMP enthaltenden Lösung zum Reaktionsgemisch gegeben. Das denaturierte Enzym wird abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit Dowex 50W-X8 (Korngröße 74-149 µ) beschickte Säule mit etwa 1 cm³ Schüttvolumen gegeben. Die Säule wird mit Wasser eluiert. Die ersten 3 ml werden verworfen, mit Ausnahme der Leerwertbestimmungen (ohne Enzym) für die diese Fraktion eine exakte Messung des zugesetzten (radioaktiven) ATP ergibt. Die nächsten 4 ml des Eluats enthalten 55 bis 70 Prozent des gesamten vorhandenen c-AMP. Diese Fraktion wird mit 0,5 ml 0,18 M ZnSO₄ und anschließend mit 0,5 ml einer äquivalenten Ba(OH)₂-Lösung behandelt. Der erhaltene Niederschlag wird abgeschleudert und die Behandlung mit ZnSO₄-Ba(OH)₂ wird wiederholt, ohne daß der erste Niederschlag aufgerührt wird. Nach dem Zentrifugieren wird 1 ml des Überstands, der [^{32}P]-c-AMP und [^3H]-c-AMP enthält, mit 15 ml Scintillator (100 g Naphthalin, 14 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 0,1 g Dimethyl-POPOP (1,4-Bis-2-(phenyloxazolyl)-benzol) pro 2 Liter Dioxan) versetzt und im Flüssigkeitsscintillationszähler gezählt. Die Menge des pro Bestimmung gebildeten [^{32}P]-c-AMP wird mit Hilfe des in jedem Fall gefundenen [^3H]-c-AMP auf die nach der Inkubation auftretenden Ausbeuteverluste korrigiert. Die Aktivitäten sind in Tabelle II aufgeführt.

Tabelle II

- 36 -

Verbin- dung Nr.	Phosphodiesterase		Protein kinase ka'	Steroidogenese in der Nebenniere *	Adenyl cyclase** T/C
	Substrat - α Niere	Hemmung- α Lunge Niere Herz			
2	0,83	129	0,08	6000	1,08
3	0,40	120	0,25	3800	
5	0,64	66,5	0,46	7200	0,95
6	0,66	2,7	0,003		
7	0,32	48,5	0,024	850	0,62
8	0,76	13,0	0,009		
10	0,66	2,7	0,056		
11	0,15	23,6	0,001	>10000	0,41
12	0,55	2,7	0,20		
14	0,99	26,0	0,075	>10000	0,69
15	0,30	2,0	0,11	3200	1,03
16		2,0	0,08		

-36-

* Steroidogenese in der Nebenniere bei c-AMP, $A_{50} = 3300 \mu\text{m}$.

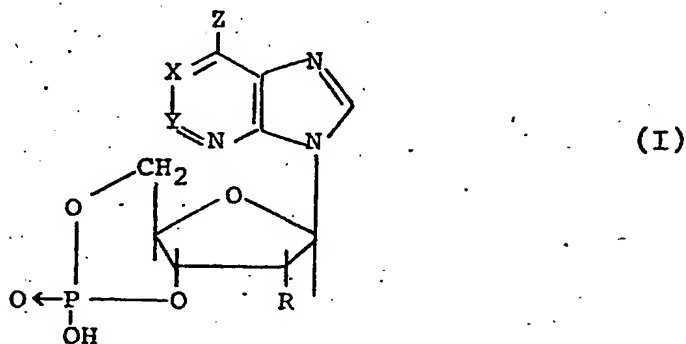
** T/C ist das Verhältnis ^(der Anzahl) Picomole von c-3',5'-AMP, das in 15 Minuten pro 1 mg Enzymprotein in Gegenwart von 1 mMol gebildet wird zur Anzahl der Picomole, die in Abwesenheit der zu untersuchenden Verbindung gebildet werden.

2405895

409835/1030

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. In der 2-Stellung substituierte Derivate von cyclischem Adenosinmonophosphat der allgemeinen Formel I

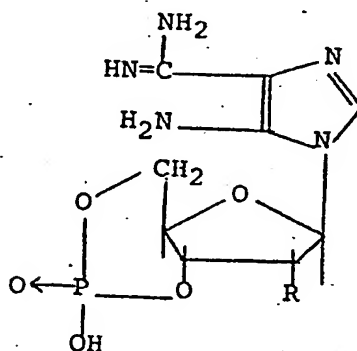


in der X ein Stickstoffatom oder ein N-Oxid bedeutet, Y ein Stickstoffatom oder einen $>CR_1$ -Rest bedeutet, wobei R_1 einen Alkyl-, Phenyl-, 2- C_5H_4N -Rest, ^(Trihalogenmethyl) die HO-, HS- oder R_2S -Gruppe ist und R_2 einen Alkyl- oder Aralkylrest darstellt, Z die H_2N - oder HO-Gruppe und R ein Wasserstoffatom, die HO- oder $R'O$ -Gruppe bedeutet, wobei R' einen C_{1-18} -Acylrest darstellt, mit der Maßgabe, daß Z nur dann die HO-Gruppe bedeutet, wenn X und Y jeweils ein Stickstoffatom darstellen, und daß X nur dann ein N-Oxid bedeutet, wenn Y ein Stickstoffatom und Z die H_2N -Gruppe darstellt, sowie die Salze dieser Verbindungen.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, in denen X ein Stickstoffatom, Z die H_2N -Gruppe und Y einen $>CR_1$ -Rest bedeutet.
3. Verbindungen nach Anspruch 2, in denen R_1 einen C_{1-8} -Alkylrest bedeutet.

4. Verbindungen nach Anspruch 3, in denen R_1 einen C_{1-6} -Alkylrest bedeutet.
5. 2-Methyladenosin-3',5'-cyclophosphat.
6. 2-Äthyladenosin-3',5'-cyclophosphat.
7. 2-Trifluormethyladenosin-3',5'-cyclophosphat.
8. 2-n-Butyladenosin-3',5'-cyclophosphat.
9. 2-(2-Methyl-1-propyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat.
10. 2-Phenyladenosin-3',5'-cyclophosphat.
11. 2-(2-Pyridyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat.
12. 2-(2-Chlorphenyl)-adenosin-3',5'-cyclophosphat.
13. 2-Hydroxyadenosin-3',5'-cyclophosphat.
14. 2-Thioadenosin-3',5'-cyclophosphat.
15. Verbindungen nach Anspruch 2, in denen R_1 einen R_2S -Rest und R_2 einen C_{1-8} -Alkylrest bedeutet.
16. Verbindungen nach Anspruch 15, in denen R_2 einen C_{1-6} -Alkylrest bedeutet.

17. 2-Methylthioadenosin-3',5'-cyclophosphat.
18. Verbindungen nach Anspruch 1, in denen X und Y jeweils ein Stickstoffatom bedeuten.
19. Verbindungen nach Anspruch 18, in denen Z die HN=Gruppe bedeutet.
20. 2-Azaadenosin-3',5'-cyclophosphat.
21. 2-Azainosin-3',5'-cyclophosphat.
22. 2-Azaadenosin-3',5'-cyclophosphat-N¹-oxid.
23. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel II

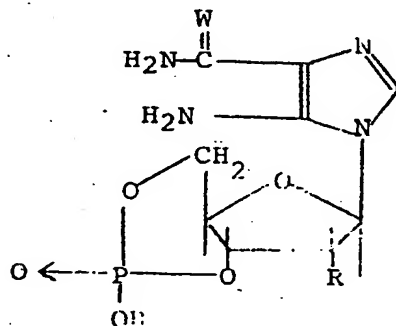


(II)

in der R die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 1 hat

- (a) mit einer R₁-Carbonsäure oder einem R₁-Carboxaldehyd zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I umsetzt, in der X ein Stickstoffatom, Y einen >CH₁-Rest und Z die

- H₂N-Gruppe bedeutet, oder
- (b) mit einem Trihalogenacetamid zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I umgesetzt, in der X ein Stickstoffatom, Y einen $>CR_1$ -Rest mit R₁ gleich Trihalogenmethyl und Z die H₂N-Gruppe bedeutet, oder
- (c) mit einem Alkyl-, Aryl-, Aralkyl- oder heterocyclischen Carboxaldehyd umgesetzt und das dabei erhaltene Produkt durch milde Oxidation zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I umgesetzt, in der X ein Stickstoffatom, Y einen $>CR_1$ -Rest, wobei R₁ ein Alkyl-, Aryl-, Aralkyl- oder heterocyclischer Rest ist, und Z die H₂N-Gruppe bedeutet, oder
- (d) mit einem aktiven Carbonsäure- oder Thiocarbonsäurederivat zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I umgesetzt, in der X ein Stickstoffatom, Y einen $>CR_1$ -Rest, wobei R₁ die HO- oder HS-Gruppe ist, und Z die H₂N-Gruppe bedeutet, und gegebenenfalls eine Verbindung, in der R₁ die HS-Gruppe ist, zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I alkyliert, in der R₁ die R₂S-Gruppe bedeutet, wobei R₂ ein Alkyl- oder Aralkylrest ist, oder
- (e) eine Verbindung der allgemeinen Formel III



(III)

in der R die vorstehende Bedeutung hat und W eine HN=, O= oder HON=Gruppe bedeutet, mit salpetriger Säure zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I umgesetzt, in der X ein Stickstoffatom oder N-Oxid, Y ein Stickstoffatom und Z die H₂N- oder HO-Gruppe bedeutet, mit der Maßgabe, daß Z nur dann die OH-Gruppe bedeutet, wenn X und Y jeweils ein Stickstoffatom darstellt und X nur dann N-Oxid ist, wenn Z die H₂N-Gruppe darstellt.

24. Verfahren zur Herstellung von in der 2-Stellung substituierten Adeninderivaten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man 5-Amino-1-β-D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin-3',5'-cyclophosphat mit einem Alkyl-, Aryl-, Aralkyl- oder heterocyclischen Carboxaldehyd in einem Alkohol unter Rückfluß erhitzt.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die Kondensation mit einem aliphatischen Aldehyd mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen etwa 5 Minuten bis 1 Stunde in Äthanol unter Rückflußkochen kondensiert.

26. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man Benzaldehyd verwendet und die Kondensation etwa 5 Minuten bis 1 Stunde in Äthanol unter Rückflußkochen durchführt.

27. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man Pyridin-2-carboxaldehyd verwendet und die Kondensation etwa 5 Minuten bis 1 Stunde in Äthanol unter Rückflußkochen durchführt.

28. Verfahren zur Herstellung von in der 2-Stellung substituierten Derivaten von cyclischem Adenosinmonophosphat, dadurch gekennzeichnet, daß man 5-Amino-1-β-D-ribofuranosylimidazol-4-carboxamidin in einem Gemisch aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel mit einem Alkyl-, Aryl-, Aralkyl- oder heterocyclischen Carboxaldehyd kondensiert und das erhaltene Kondensationsprodukt mit einem Dehydrierungsmittel umsetzt.

29. Arzneipräparate, bestehend aus Verbindungen nach Anspruch 1 und üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln und/oder Hilfsstoffen.